第19章

Nitric oxide

一氧化氮(Nitric Oxide)

早期：

--小

--結構簡單

--不穩定

--毒性強

近代：

---訊息分子

---免疫功能

---血管舒縮

---神經傳遞

1998年 諾貝爾獎：

Robert Furchgott，Ferid Murad確認NO之生物活性角色

早期研究

1. 對生物體有害無益。
2. NO:

   Free Radical :未結合電子。

   Life Time : 6-10 sec(unstable)

   會與水及氧分子反應生成硝酸根(NO3-)與亞硝酸根(NO2-) 。

早期研究

3. NO來源:

(1) 食物

＊1965, P. N. Magee & J. M. Barnes

硝製食品之硝酸根:在體內→硝基化合物(致癌物)

ex: 燻肉 、香腸……

(2) 1981, S. R Tannenbaum

＊食物中僅含少量之硝酸鹽,但排出之硝酸根仍高(人、大鼠)。

＊腹瀉→硝酸根排泄↑↑

腹瀉← ？ →硝酸根產生

＊Rats → inj. endotoxin

inflammatory reaction

硝酸根排泄↑

免疫細胞 & NO

1.內生性硝酸根 & 發炎反應

(1) M.A. Marletta-----

* 先天性缺乏 macrophage 之 mice

→硝酸根排泄↓↓

* in vitro:

endotoxin, γ-interferon → macrophage cell

↓產生

硝酸根

* NO 的合成(synthesis)

macrophage → 硝酸根

↑

Arginine

enzyme (in macrophage ; NO synthase)

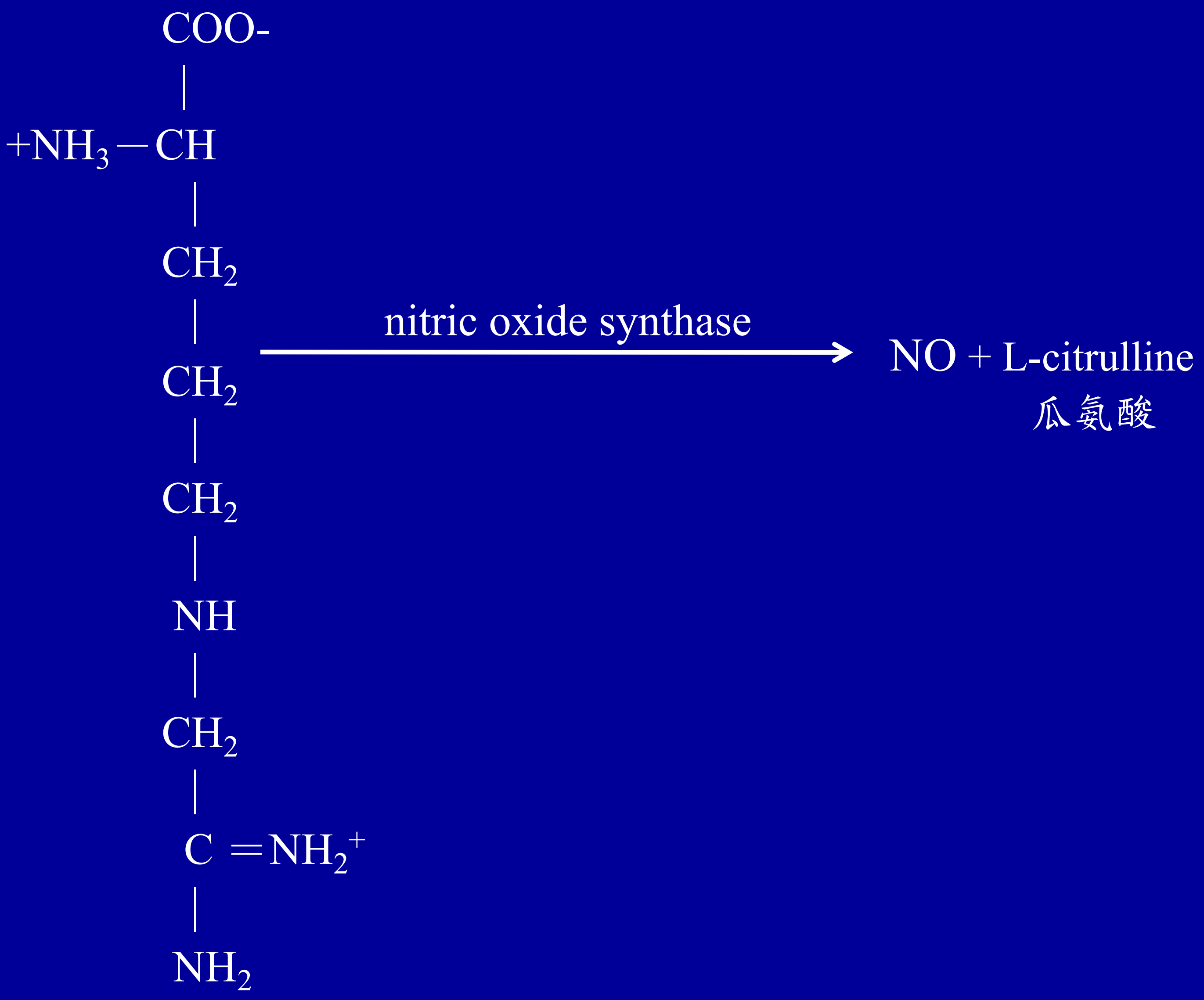
↓

Arginine → unstable interactivor → Citrulline

(NO)

↓

NO_3^-&NO_2^-



L-arginine（血管內皮細胞之精氨酸）

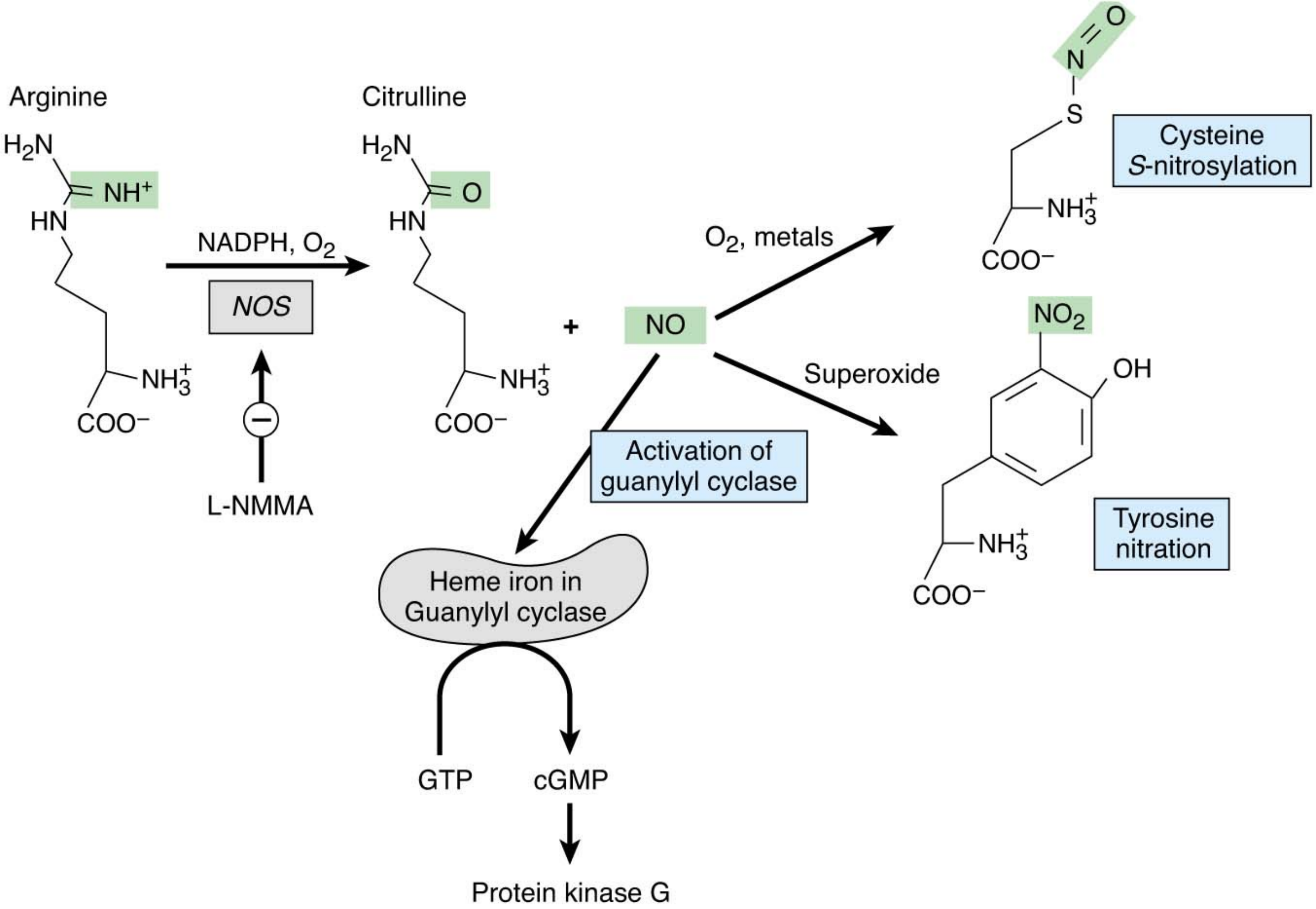


FIGURE 19–1 Synthesis and reactions of nitric oxide (NO). L-NMMA inhibits nitric oxide synthase. NO complexes with the iron in hemoproteins (eg, guanylyl cyclase), resulting in the activation of cGMP synthesis and cGMP target proteins such as protein kinase G. Under conditions of oxidative stress, NO can react with superoxide to nitrate tyrosine.

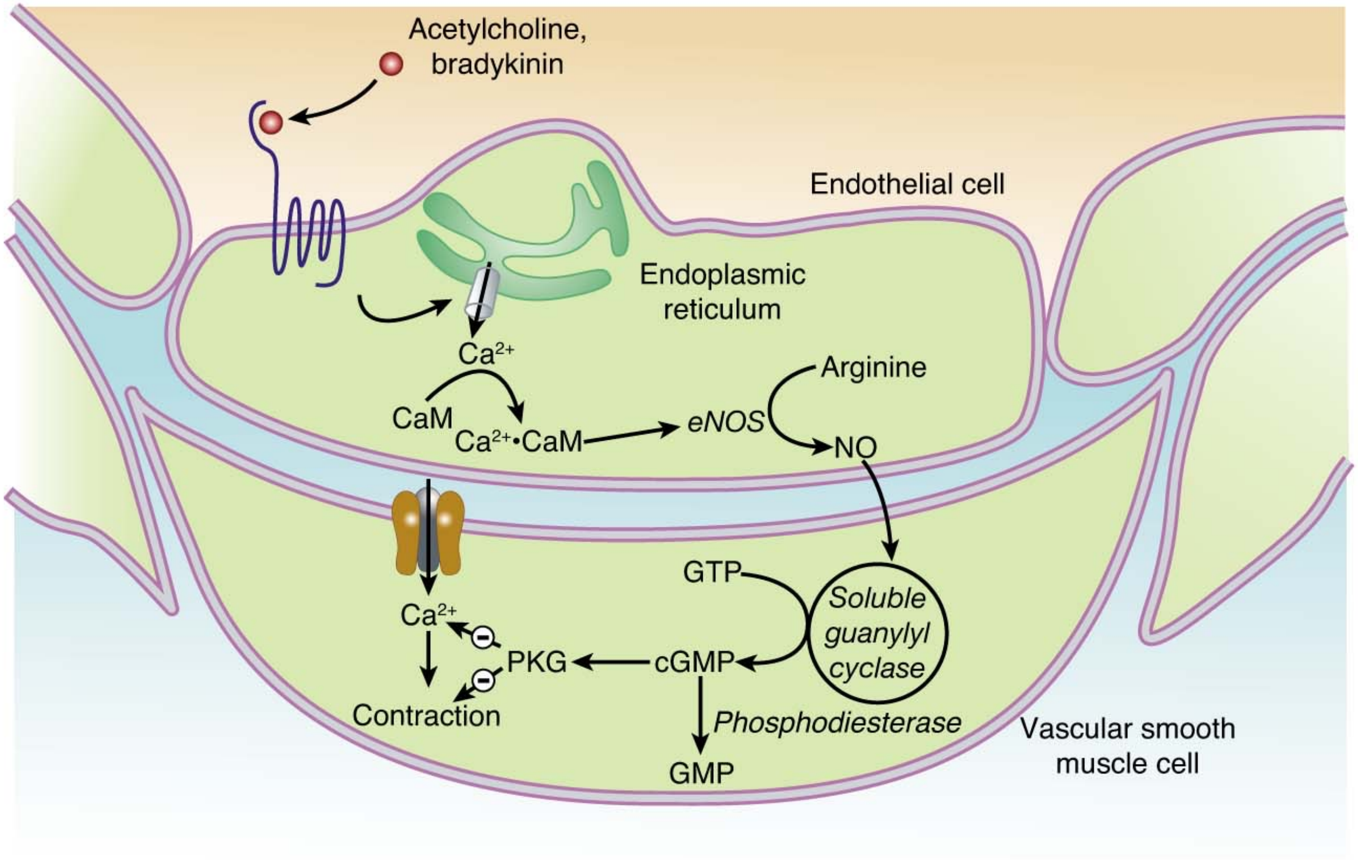


FIGURE 19–2 Regulation of vasorelaxation by endothelial-derived nitric oxide (NO). Endogenous vasodilators, eg, acetylcholine and bradykinin, activate NO synthesis in the luminal endothelial cells, leading to calcium (Ca^{2+}) efflux from the endoplasmic reticulum into the cytoplasm. Calcium binds to calmodulin (CaM), which activates endothelial NO synthase (eNOS), resulting in NO synthesis from L-arginine. NO diffuses into smooth muscle cells, where it activates soluble guanylyl cyclase and cGMP synthesis from guanosine triphosphate (GTP). cGMP binds and activates protein kinase G (PKG), resulting in an overall reduction in calcium influx, and inhibition of calcium-dependent muscle contraction. PKG can also block other pathways that lead to muscle contraction. cGMP signaling is terminated by phosphodiesterases, which convert cGMP to guanosine monophosphate (GMP).

(2) J.B. Hibbs ----

macrophage ----? → 殺死腫瘤細胞

* macrophage 和腫瘤細胞一起培養：

<I>若培養液中缺乏arginine

→macrophage無法殺死腫瘤細胞

<II>若培養液中加入methylarginine

(第一個 NO synthase inhhibitor)

→macrophage無法產生硝酸根

→無法殺死腫瘤細胞

NO-訊息分子(1)

1.神經如何使血管擴張?

神經→血管收縮or 擴張

(1) 交感神經→norepinephrine

→作用在血管肌肉上之細胞受體

→血管收縮

(2) 假說:

肌肉細胞亦具 acetylcholine (ACh) 受體

→神經末梢釋放 ACh

→作用在血管肌肉上之 acetylcholine receptors

→血管擴張

NO-訊息分子(2)

(3) 1980 , R. E. Furchgott--

* 除去血管上最內層之內皮細胞層

  →ACh 無法使血管肌肉放鬆

* Endothelial-derived Relaxing factor (EDRF)

  Ach 藉著內皮細胞生成 EDRF

  →EDRF 擴散至肌肉細胞

  →肌肉放鬆

(4) 直接 EDRF 純化　？　失敗

EDRF →cGMP (second messenger) →……..

(in muscle cell)

NO-訊息分子 (3)

2.減輕心絞痛藥物如何作用?

(1)Nitroglycerin

* 黃色炸藥的主成分
* 十九世紀末→治療心臟疾病
* Nitroglycerin 可使冠狀動脈擴張

(2)1970 , F. Murad ------

* Nitroglycerin 及其衍生物
  →對冠動脈無作用
* 人體代謝 Nitroglycerin → NO (擴張冠狀動脈)
* NO 使血管鬆弛時 →產生cGMP

NO-訊息分子 (4)

(3) 1986, R. F. Furchgott et al.--

預測: EDRF ⟵⟶ NO

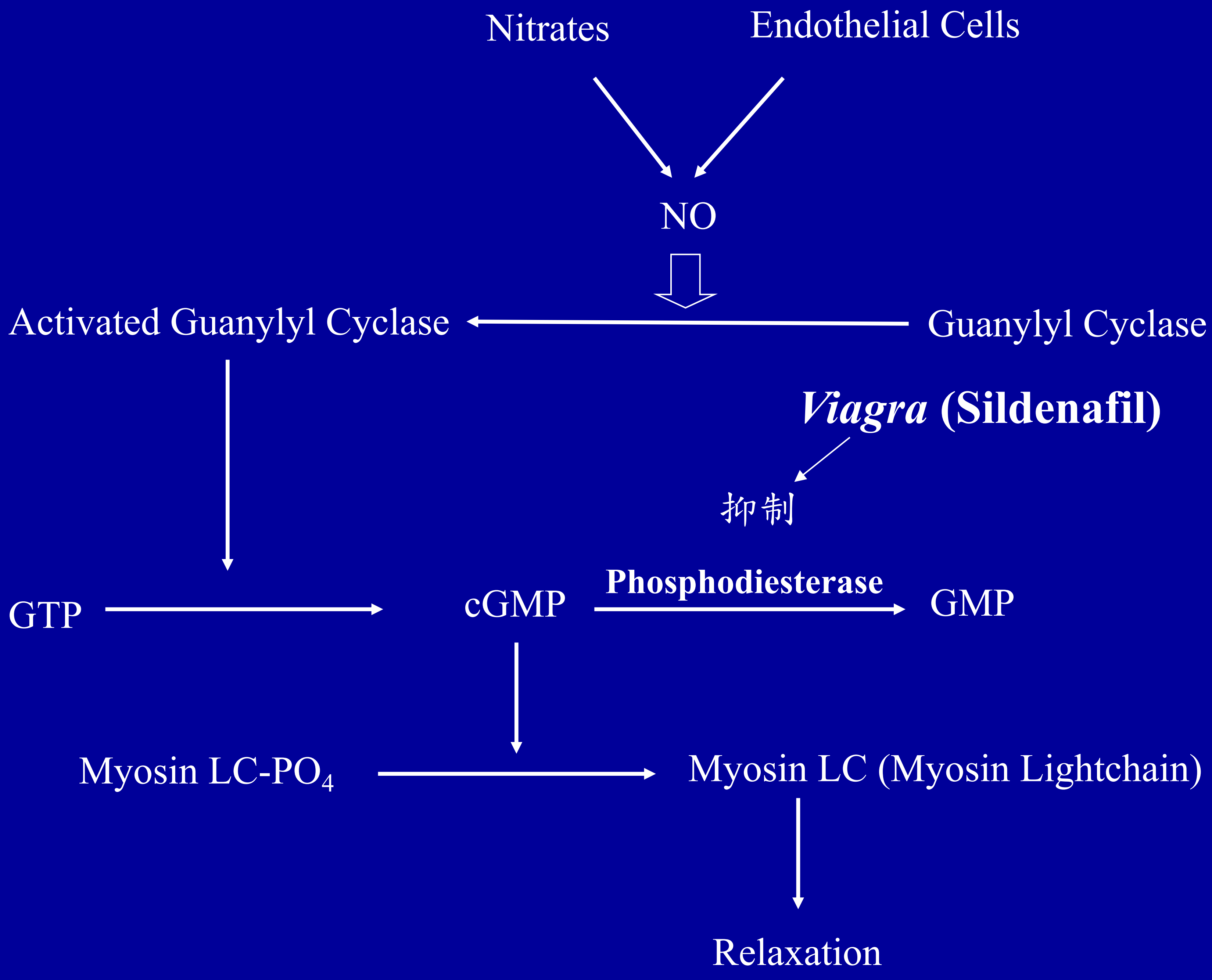
(4) 1987, S. Moncada----

證實： EDRF = NO

* 刺激血管內皮細胞使釋放EDRF

同時記錄內皮細胞釋放之NO

⟶ EDRF = NO


Nitrates
Endothelial Cells
NO
Activated Guanylyl Cyclase
Guanylyl Cyclase
Viagra **(Sildenafil)**
抑制
GTP
cGMP
Phosphodiesterase
GMP
Myosin LC-PO_4
Myosin LC (Myosin Lightchain)
Relaxation

3. NO 與Septic shock

敗血病(sepsis)是由於感染而引起全身系統性發炎反應

→Endotoxin 從細胞細胞壁與endogenous tumor necrosis factor-α 及其他cytokines→induce iNOS 在macrophages, neutrophils 及T cell 合成 。

→B. P. ↓ shock, death.

Hypotension is reversed by NOS inhibitor.

TABLE 19–2 Oxides of nitrogen.

Name	Structure	Known Function
Nitric oxide (NO)	$N{=}O^{\bullet}$	Vasodilator, platelet inhibitor, immune regulator, neurotransmitter
Peroxynitrite (NO_3^-)	$O{=}N{-}O{-}O^-$	Oxidant and nitrating agent
Nitroxyl anion (NO^-)	$N^-{=}O$	Can form from nonspecific donation of an electron from metals to $NO^{\bullet}$ Exhibits NO-like effects, possibly by first being oxidized to NO
Nitrous oxide (N_2O)	$N^-{=}N^+{=}O$	Anesthetic
Dinitrogen trioxide (N_2O_3)	$O{=}N{-}N^+{=}O$ | O^-	Auto-oxidation product of NO that can nitrosylate protein thiols
Nitrite (NO_2^-)	$O{=}N{-}O^-$	Stable oxidation product of $NO^{\bullet}$ Slowly metabolized to nitrosothiols, and decomposes to NO at acidic pH
Nitrate (NO_3^-)	O^- | $O{=}N^+{-}O^-$	Stable oxidation product of $NO^{\bullet}$

4. NO 與 Inflammation

最近研究顯示:

NO 由於活化 cyclooxygenase isoenzyme 2 (cox-2)

→而刺激發炎物質prostaglandin之合成

→當發炎時→ 血管擴張，血管穿透性↑水腫。

∴抑制NO 途徑對發炎疾病，包括關節炎可能有助益。

5. NO 與 Respiratory Disorders :

– NO 可舒張呼吸道平滑肌，因此可當作支氣管舒張劑。

– Inhaled NO 改善 cardiopulmonary function(pulmonary artery hypertension)

6. NO↑ 之其他作用:

(1) 陰莖勃起之控制因子(陰莖勃起之生理為陰莖內之神經末梢會分泌NO)

*Viagra使血管平滑肌細胞內cGMP增多

(2) 血壓:

* NO synthase inhibitor → B. P.↑

* 影響程度:

NO > NE, renin, angiotensin….

* Hypertension 等血壓疾病:

→可能與 NO 代謝失控有關。

7. NO 與周邊神經系統:

- Nonadrenergic, noncholinergic (NANC) neuron

  廣泛分布在周邊組織，尤其是G-I 。

  NO 是 NANC 之 mediator

  NANC 釋放NO → 陰莖即勃起

  →NO促進海綿體平滑肌舒張

  →陰莖勃起

8. NO與中樞神經系統

NO & BRAIN

- **1. 1982，T. Deguchi (日本)-----**

  *腦中 cGMP 之形成需arginine

  2. 1989，S. Moncada----

  arginine→NO→cGMP

  ↘enzyme↗

  3. Glutamate & NO

  (1) 1989, J. Garthwaite ----

  *NMDA(N-methyl-D-asparyate) :

  →刺激培養之腦薄片的NMDA 受體時

  會產生似NO ，不穩定、易反應之物質。

  (2) 1989，S. H . Snyder & D. S. Bredt----

  ◎利用放射性同位素的arginine:

  * 測定放射性citrulline 之產生速率→ 定量NO.的生成

  ◎ in vitro

  →以NMDA 或 glutamate 刺激培養之小腦薄片的 NMDA 受體

  →NO 的生成速率:↑3倍

  (NMDA刺激幾秒鐘後)

  *?enyme 作用時間

腦中NO位於何處?

◎利用免疫組織化學法:

(螢光或放射性之抗體抗原)

＊ NO太小無法產生抗體

→NO synthase 抗體

→純化NO synthase : calmodulin

＊ glutamine

→NMDA receptor

→open cell membrane ion channel

→Ca^{2+} input ＋calmodulin

→unactive NO → active NO

＊千分之幾秒

腦中NO位於何處?

- 腦中NO之分布 (P. M. Hwang)

  →利用免疫組織化學法: NO synthase 抗體

  →少數神經細胞

  ex. 大腦皮層2%神經細胞含NO synthase

  (血管內皮細胞)

- 腦中NO之作用
  - Moncada, Garthwaite and Snyder :

  →神經組織中NO 亦會使突觸後細胞之cGMP 增加。

  →(1)NO →cGMP → ……

  (2)Neurotransmitter
- NO & Neurotranamitter
  - 小腸腸肌神經叢(myenteric plexus)
  - 神經 (NO synthase) → 小腸腸肌肉放鬆
  - 證明:

  (1)直接加NO至小腸→小腸腸肌肉放鬆

  (2)電刺激 myenteric plexus → 小腸腸肌肉放鬆，此作用可被NO synthase inhibitor所阻斷。

- NO 與一般Neurotransmitter 之比較:

1.Neurotransmitter

2.NO:

(1)不需儲存，製造出來即直接擴散出去。

不需受體，直接作用於突觸後。

(2)作用位置:

guanylyl cyclase 活性中心的鐵離子

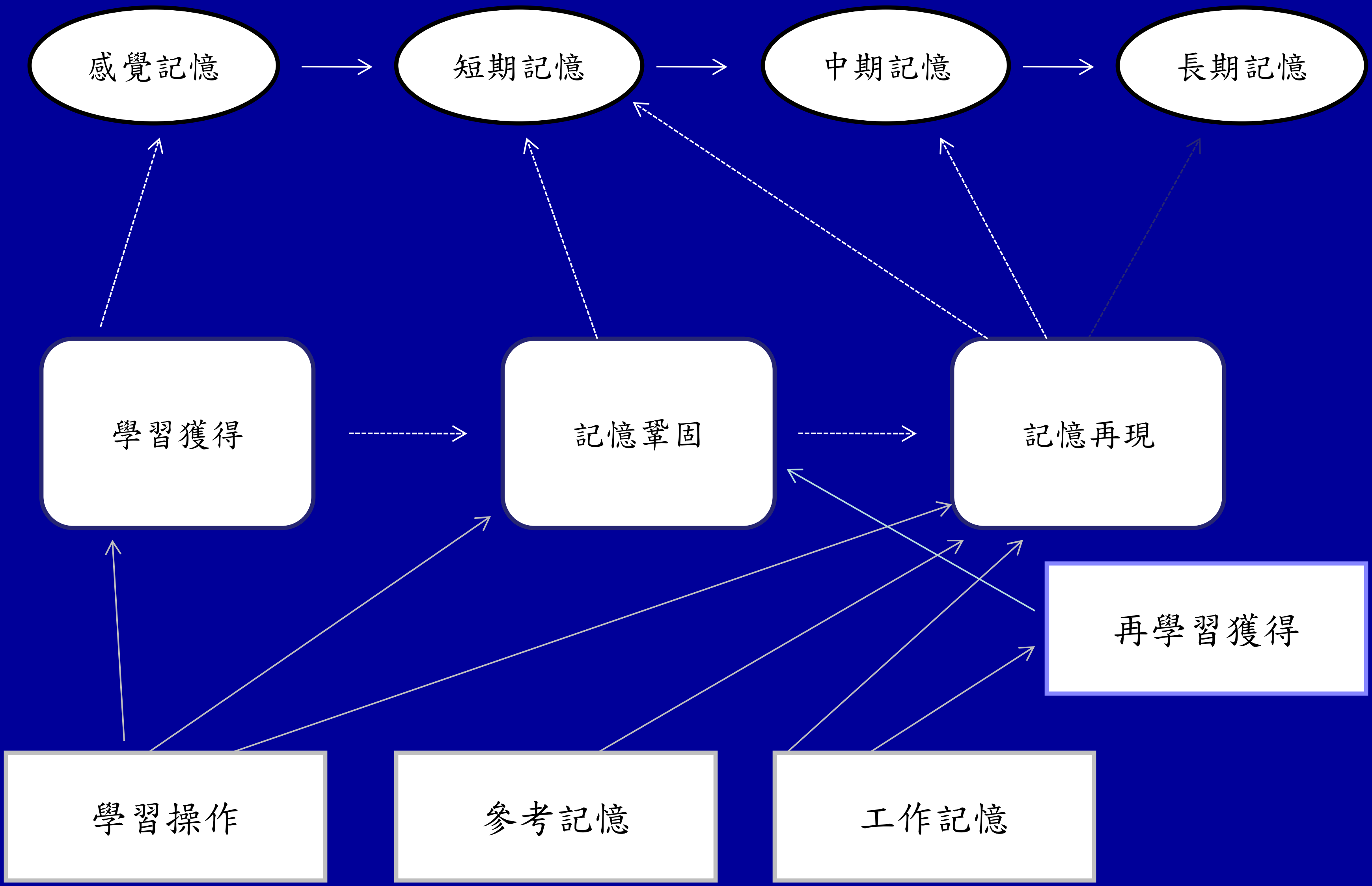
→guanylyl cyclase 含heme (Fe^{++})

NO^{+} Fe^{++} → guanylyl cyclase

形狀改變、活性增加 cGMP↑

- NO & LEARNING and MEMORY :
  1. long term potentiation, LTP
  2. Hippocampus
  3. glutamate & NMDA receptor

記憶之形成過程



NO & BRAIN CELL KILLER :

1. 中國餐館症候群

味精→glutamatic sodium

大量glutamate→neurotoxin

* brain tissue 受傷

→glutamate大量釋放

→鄰近glutamate 受體 (NMDA) 受到高頻率、高濃度刺激

→已受傷之腦細胞，被興奮，則死得更多更快

* glutamate → NO

→適量→cGMP ↑

→過量→巨噬細胞 (macrophage, cell killer)

NO & BRAIN CELL KILLER :

* in vitro brain cortex cell
  →高濃度 NMDA→Kill 90% cell
  →加入NO synthase inhibitor
  →NMDA 不能殺死細胞
* Scatton :
  中風 mice→ 給NO synthase inhibitor → 傷害減少

- NO & P-450:
  * NO synthase & cytochrom P-450 reductase
  * P-450:

    1.肝代謝→電子供給者

    2.heme oxygenase 分解血紅素→電子供給者

Heme oxygenase (HO, 血基質氧化酶)

- 是血基質 (heme)代謝過程中的限制酶，可將heme代謝為→鐵 (iron), 一氧化碳 (CO)及膽綠質 (biliverdin)
- 膽綠質可進一步經膽綠質還原酶 (biliverdin reductase)轉換為→膽紅素 (bilirubin)

- Bilirubin 具有抗氧化作用：

  主要是透過清除自由基、抑制NADA及PKC的活性

  →減少氧化壓力

  或藉增加NO的的生體可用率

  →降低內皮細胞傷害及增加血管活性。

  ∴經HO-1後產生之bilirubin在心血管系統中具有相當的保護作用。

- 尋找更有效的HO-1誘發劑

  →將是治療心血管疾病的新標的。